

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Charakterizace bakteriálních genů kódujících extradiolovou  
dioxygenasu DbtC-typu s bioremediačním potenciálem pro  
aromatické látky v lokalitě Hradčany

Characterization of bacterial genes encoding DbtC-like extradiol  
dioxygenase with bioremediation potential for aromatic compounds in  
locality Hradčany

Diplomová práce

Praha 2010

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.

Školitel: RNDr. Maria Brennerová, CSc.

Vypracovala: Bc. Renata Šnajdrová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Marie Brennerové, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne .....

.....

Renata Šnajdrová

## Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Marii Brennerové, CSc. z Laboratoře molekulární genetiky bakterií Mikrobiologického ústavu AV ČR v.v.i. za poskytnutí podmínek pro vypracování diplomové práce, pomoc při jejím sepisování, za projevenou ochotu, velice přátelské jednání a spoustu cenných rad. Vřelé poděkování si zaslouží rovněž RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, která se ujala vedení této práce.

Dále bych chtěla poděkovat zejména Jiřině Josefiové za velmi obětavou spolupráci a velkou pomoc především s experimentální částí diplomové práce. Poděkování patří i ostatním členům laboratoře - Martině Pravečkové a Olesye Korotkevych za vytváření příjemného pracovního prostředí a věcné připomínky a v neposlední řadě Věře Reimannové za technickou podporu v průběhu mé práce.

Na závěr bych ráda poděkovala mé rodině především za psychickou a finanční podporu během mého studia.

# Abstract

Aromatic pollutants pose a serious environmental problem. Petroleum and its derivatives belong to the most abundant contaminants in the Czech Republic and their sanitation is a priority objective for improving the life quality of the population. Bioremediation is a technology taking advantage of the natural capacity of soil and water microbial community to degrade environmental pollutants. Deeper understanding and detailed knowledge on specialized bacterial species, pathways and genes is required for selection, optimization and application of targeted bioremediation approach and for monitoring of its results.

Recent analysis of a metagenomic library constructed from highly contaminated soil of the former military air-base Hradčany has identified a novel group of catabolic genes encoding extradiol dioxygenase similar to DbtC of *Burkholderia* sp. DBT1. The DbtC-like enzymes are among the three priority groups of extradiol dioxygenases with biodegradation relevance for the locality. The present study of soil bacterial isolates and metagenomic fosmid clones harboring the genes of interest gained evidence about the *dbtC*-like genes as a part of highly mobile gene cassette. Transposon insertion mutagenesis identified the genes joined with the expression of the extradiol dioxygenase activity. The *dbtC*-like genes were found at  $4.12 \times 10^4$  copies per ng DNA in the contaminated soil. Presence of up to two copies in the metagenomic clones with average size 33.5 kbp and their phylogenetically diverse distribution indicates a natural selectivity for the *dbtC*-like genes and the encoded enzymes with *meta*-cleavage activity to catecholic substrates. On the other hand, *in vitro* cultivation of bacterial isolates carrying the *dbtC*-like genes has led to fast loss of the genetic marker as confirmed by quantitative PCR analyses. Their expression is likely a part of the microbial biodegradation network where the encoded enzymes facilitate the degradation of catabolic intermediates produced by other enzymes in the contaminated sites. (In Czech)

**Keywords:** biodegradation, aromatic compounds, extradiol dioxygenases, *dbtC*-like genes

# Abstrakt

Aromatické polutanty představují vážný problém z hlediska znečištění životního prostředí. Významným zdrojem těchto látek s negativním dopadem na lidské zdraví je ropa a ropné produkty, které patří k nejhojnějším a tím pádem i k nejčastěji sanovaným kontaminantům v České republice. K jejich odstranění z životního prostředí lze s výhodou využít bioremediačních přístupů, které využívají přirozené schopnosti mikrobiální komunity degradovat environmentální polutanty v kontaminovaných půdách či vodách. Za účelem pomoci při výběru, optimalizaci a aplikaci bioremediačních postupů a monitorování jejich výsledků se věnuje velká pozornost studiu bakteriálních druhů, metabolických drah a genů s bioremediačním potenciálem.

Dřívější analýzou metagenomové knihovny zkonstruované z půdní DNA z vysoce kontaminované lokality bývalé vojenské letecké základny Hradčany byla objevena nová skupina katabolických genů kódujících extradiolovou dioxygenasu podobnou DbtC u *Burkholderia* sp. DBT1. Enzymy podobné DbtC představují jednu ze tří hlavních skupin extradiolových dioxygenas účastnících se biodegradace ve zmíněné lokalitě. Na základě studia bakteriálních půdních izolátů a fosmidových klonů z metagenomové knihovny nesoucích zkoumané geny lze usoudit, že geny podobné *dbtC* jsou součástí vysoce mobilní genetické kazety. S využitím transpozonové mutagenese byly identifikovány geny významné pro extradiolové štěpení aromatických substrátů. Bylo zaznamenáno vysoké zastoupení genů *dbtC*-typu v kontaminované půdě ( $4,12 \times 10^4$  kopií na 1 ng půdní DNA). Přítomnost až dvou kopií genu u klonů z metagenomové knihovny o průměrné velikosti 33,5 kpb a jejich fylogeneticky odlišná distribuce poukazuje na přírodní výběr zkoumaných genů a kódovaných enzymů pro *meta* štěpení katecholových substrátů. Kvantitativní PCR analýza potvrdila, že v průběhu *in vitro* kultivace bakteriálních izolátů nesoucích geny podobné *dbtC* dochází k jejich velmi rychlé ztrátě. Exprese zkoumaných genů je tedy pravděpodobně podmíněna kooperací mezi jednotlivými bakteriemi a kódované enzymy usnadňují degradaci meziproductů produkovaných dalšími enzymy vyskytujícími se v kontaminovaném prostředí.

**Klíčová slova:** biodegradace, aromatické látky, extradiolové dioxygenasy, geny podobné *dbtC*